

Escherichia coli による Dehydro-L-ascorbin 酸の還元（第3報） *E. coli* の Sonic oscillation による破壊

牧 善 輔

Reduction of dehydro-L-ascorbic acid by *Escherichia coli* (Ⅲ)
Sonic disruption of *E. coli*

ZENSUKE MAKI

緒 言

Dehydro-L-ascorbic acid (DHA) は *E. coli* suspension の存在に於て、glucose, formate 等を水素供与体とすると、嫌気状態において容易に還元されて、L-ascorbic acid (AA) になることはよく知られている^{1) 2) 3)}。然し、*E. coli* 中の DHA 還元酵素を cell free にとりだすことは困難である^{4) 5)}。先に著者は集菌した *E. coli* にドライアイス処理を繰返して得られた、cell free extract で DHA を還元したが、total activity の 16 % が得られたにすぎなかった⁶⁾。cell 破壊の方法としては、この他に sonic oscillation がよく用いられている⁷⁻⁹⁾。以下細胞の破壊と DHA 還元酵素の分布について、sonic oscillator を使用して得られた実験結果につき報告する。

実 験 方 法

E. coli suspension の調製；1 % ペプトン，1 % 肉エキス，0.3 % 食塩，0.5 % glucose を含む培養液 8 l. に *E. coli* を 37°C にて 22 時間培養した後，遠心分離により菌体を集め，M/15 phosphate buffer (pH 6.47) で 2 回洗滌し，phosphate buffer 100 ml に懸濁したものをを用いた。その 1 ml の乾物量は平均 37.8 mg であった。この懸濁液を -20°C に保存すれば，2 ヶ月にわたって酵素活性に変化はなかった。

音波処理；100W. 20KC. 及び 250W. 10KC. の sonic oscillator に一定時間かけた後，0°C で 5,000 r.p.m. (2,000×G)，10 分間遠心分離して，沈澱する intact cell を除き，上澄液を cell extract とした。

Turbidity；音波処理液を 20 倍に稀釈して，optical path 5 mm のセルを用いた際の 600m μ に於ける吸光度で，turbidity を表した。

DHA 還元酵素力の測定；M/15 phosphate buffer (pH 6.47) 4.5 ml, 0.1M substrate 溶液 0.5 ml, 酵素液

1.0 ml, 及び水 0.5 ml を特製嫌気反応容器の主室に入れ，37°C の恒温槽で窒素ガスを 10 分間通じた後，側室の DHA 溶液 (2 mg/ml AA 溶液を臭素酸化したもの) 0.5 ml を主室に導き，更に窒素ガスを通じながら反応せしめ，一定時間の後反応液 1 ml を取出し，之に 5 % メタ磷酸 9 ml を加え，15 分間放置後濾過する。濾液一定量をとって Roe 法^{10) 11)}により DHA 量を測定し，之より DHA の還元により生じた AA 量を算出した。還元された DHA 量は反応初期に於ては略々直線状に増加するので，酵素力を比較するときは，始めの 15 分間に還元された DHA 量で示した。

Dehydrogenase 活度の測定；Thumberg 管主室に M/15 phosphate buffer (pH 6.47) 1 ml, 0.1M substrate 溶液 0.5 ml 及び酵素液 0.5 ml を入れておき，之に 10⁻³ M methylenblue 溶液 1.0 ml を側室より加え，色素の脱色に要する時間を 37°C に於て測定した。

実験結果及び考察

音波処理による cell 破壊効果；*E. coli* suspension を 15 ml 宛とり，100W. 20KC. の sonic oscillator に 5 分，10 分，20 分間かけてその濁度及び生菌数を測定し，更に 5,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して得られた上澄液の，DHA 還元力及び窒素量を測定した結果は Table 1, 2 に示す通りである。

尚 Table 1 に示した値の夫々の原液に対する百分率の対数を縦軸に，音波処理時間を横軸にとってみると略々直線関係が成立する (Fig 1)。

Table 1 音波処理による cell の破壊効果

処理時間	turbidity	生菌数/ml	extract の Nmg/ml
原 液	0.91	6.0 × 10 ¹⁰	3.663
5 分	0.59	1.3 × 10 ¹⁰	1.809
10 分	0.31	1.7 × 10 ⁹	3.019
20 分	0.10	1.6 × 10 ⁸	3.219

Table 2 cell extract による DHA 及び methylenblue の還元

反応時間 処理時間	15 分	30 分	45 分	m.b.の脱色 時間
原 液	800	823		4 分
5 分	148	268	456	5 分30秒
10 分	306	540	633	4 分
20 分	224	430	570	4 分30秒

DHA の還元は生成された AA の γ 数で示した。
原液は 5 倍に稀釈したものである。
水素供与体はすべて formate を用いた。

Fig. 1 音波処理時間と turbidity, 生菌数及び溶出窒素量の関係

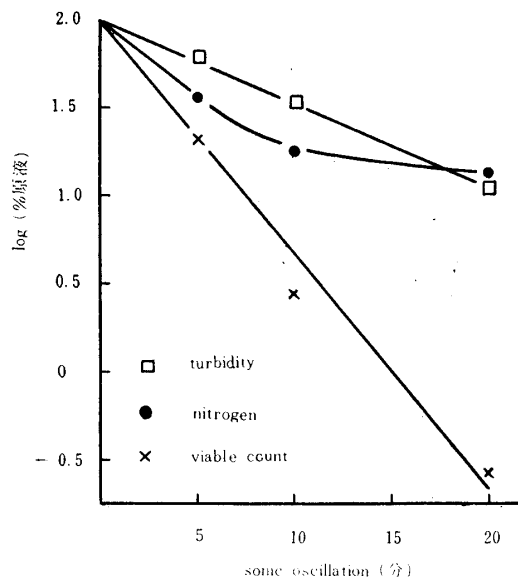


Table 1 及び Fig 1 に示した通り, turbidity の減少及び生菌数の減少の割合は音波処理の時間に比例する。又, cell extract 中に含まれる窒素量は始めは速かに増加するが, 時間の経過と共に増加速度は減少する。之は始めのうちは cell envelope の一部が傷つけられて細胞液が cell extract 中に出て来るが, cells の大部分が傷つけられた後, 即ち生菌数が 1 % 以下となつてから出て来る窒素は主として cell envelope そのものの破壊によると考えられる⁴⁾。

DHA 還元力は窒素 1 mg 当りの activity を比較すると夫々原液では 1095, 5 分処理では 81, 10 分処理では 101, 20 分処理では 69 となり, 音波処理による cell extract の activity は非常に小さい。尚 20 分処理の場合は 10 分処理に比し窒素量が増加しているにもかかわらず, activity は逆に減少している。

音波処理による酵素の不活化; cell suspension から音波処理により cell extract を得るにあたり, 出来る

だけ酵素の破壊を少くするために, 容器一杯に(約 18ml) suspension を満し, 水素ガスを通じて液中の空気を除き密栓して氷水で冷却しつつ, 夫々 10 分, 20 分, 及び 40 分の音波処理 (100W, 20Kc) を施した。又, 45ml の suspension を大型の容器に入れ水素ガスを通ずる代りに, cystein を 0.05% 加えて音波処理 (250W, 10Kc) を 15 分間行った。そして夫々の処理液を 5,000 r.p.m. 10 分間遠心分離して上澄と沈澱に別け, 沈澱は上澄と等量の buffer に suspend して, 夫々の窒素量及び DHA 還元力を測定した。その結果は Table 3, 4 に示す通りである。

Table 3 音波処理により溶出する窒素量

音波処理液	窒素量 mg/ml	原液に対する%
原 液	2.87	100
10分 { 上 澄	1.32	45.9
{ 沈 澱	1.72	
20分 { 上 澄	1.46	50.8
{ 沈 澱	1.54	
40分 { 上 澄	1.93	67.3
{ 沈 澱	0.94	
250W { 上 澄	2.14	80.6
15分 { 沈 澱	0.64	

Table 3 の結果より容器一杯に coli suspension を満すと cell の破壊率は著しく低くなり, 40 分の処理で 67.3 % の窒素が cell extract に溶出するにすぎないことがわかった。250W の処理では破壊力が強く 15 分間で 80.6 % の窒素が cell extract に含まれる。

又, 音波処理後即ち遠心分離によって沈澱を別ける前の activity は, 酸化による酵素の破壊を出来るだけ防止するようにして行つても, 10 分, 20 分, 40 分の処理で還元力は夫々原液の 55%, 44%, 28% に低下している。250W の処理では(此の場合は水素ガス置換をしないで cystein 0.05% を加えた) 24% に減少している。之に反し methylen blue 還元の活度は音波処理によりあまり低下していない。

250W 処理では酵素が最も強く破壊されているにもかかわらず, cells の 80.6% 迄(窒素量で)が cell extract 中に溶出されている為, extract の activity は最も強い。このことは DHA 還元酵素が cell envelope にあって, 強力な音波処理を行わないと容易に小さい particle にならないためと思われる。又, どの区分でも沈澱部分に強い activity が残っているという結果によつても上記の推察が裏付けられよう。

cell extract の高速遠心分離による分別; 250W, 10

Table 4 DHA 及び methylen blue の還元
に及ぼす音波処理の影響

酵素液	反応時間	15分	30分	45分	activity/mgN	mb脱色時間
sonic oscillation 10分						
原液		607	780		1065	5分20秒
遠沈前		569	760		599	4分
上澄		120	290	455	91	7分
沈澱		430	750		500	4分20秒
sonic oscillation 20分						
遠沈前		458	739	750	482	4分
上澄		186	408	622	114	4分
沈澱		419	732	750	544	4分
sonic oscillation 40分						
遠沈前		288	597		303	4分
上澄		269	553	688	139	3分30秒
沈澱		222	459	563	472	5分
sonic oscillation (250W) 15分						
遠沈前		246	490	701	260	5分
上澄		405	695		189	3分30秒

原液: coli suspension を5倍に稀釈したものである。

遠沈前: 音波処理後遠沈にかける前であり3倍に稀釈した。

沈澱: 等量の buffer に suspend して更に2倍に稀釈した。

Kc の音波処理により得た cell extract を 0℃で 10,000 r.p.m. (9,000×G), 30分間遠心分離し, その沈澱は等量 (40ml) の buffer に suspend し, 上澄液はその一部を spinco で (100,000×G, 60分) 上澄液, 沈澱の fraction に別け, 夫々の酵素力を測定した。

Table 5 各 fraction による DHA 及び methylen blue の還元

酵素液	反応時間	10分	20分	40分	Nmg/ml	m.b脱色時間
1		483	785	815	3.509	2分10秒
2		105	210	359	1.630	5分40秒
3		356	698		1.879	3分50秒
4		0	36	55	1.120	60分
5		192	373	690		6分30秒

水素供与体には formate を用いた。

酵素液 1) cell extract 1ml, 2) 9,000×G 上澄液 1ml, 3) 9,000×G 沈澱 1ml, 4) 100,000×G 上澄液 1ml, 5) は 3) 0.5ml+4) 0.5ml である。

100,000×G, 60分間遠心分離した処理液の上澄液には DHA, methylen blue 何れに対しても殆んど還元力が無かった。formic dehydrogenase 活性は 9,000×G 上澄液に可成りあるにもかかわらず, DHA-還元の activity の大部分は 9,000×G 沈澱部分にあり, 比較的大きな particle 中に存在する。又この沈澱 fraction に soluble fraction を加えても余り効果はなかった。之等の fractions について formate の他に glucose, citrate, malate, succinate を水素供与体として DHA 還元酵素力並びに methylenblue 脱色時間を測定した。

Table 6 各種水素供与体による DHA 及び methylenblue の還元

H-donor	反応時間	10分	20分	40分	mb脱色時間
9,000×G 上澄液					
glucose		80	195	415	16分
citrate		77	188	357	34分
malate		95	160	297	60分以上
succinate		60	130	280	60分以上
blank		55	105	190	60分
9,000×G 沈澱					
glucose		308	660	903	3分30秒
citrate		171	317	626	19分
malate		70	165	371	60分以上
succinate		108	220	511	19分
blank		105	225	460	19分

酵素液は 2.0ml, mb の還元には酵素液 1.0ml 色素液 0.5ml を用いた。

いずれの場合も methylen blue の脱色即ち dehydrogenase activity が弱く, 従って DHA の還元活度も弱かった。malate では blank に比しむしろ阻害がみられた。glucose では生菌の suspension を用いると formate と同じ位の activity を示すが, cell free では非常に弱い。一方 succinate では, 上澄液の methylen blue 還元力は非常に小さいにもかかわらず, DHA は可成り還元されている。

要 約

1. *E. coli* suspension を sonic oscillator により破壊し, 生菌数の減少, turbidity の減少, cell extract 中に溶出する窒素量及び DHA 還元酵素活性を測定した。その結果 DHA 還元酵素は最も破壊され難い細胞部分に含まれており, 溶出し難い。

2. cell extract を遠心分離法によって分別し, 各

fraction の脱水素酵素力並びに DHA 還元酵素力を測定した。その結果 soluble fraction には formic dehydrogenase 力, DHA 還元酵素力共に殆んどなく, 10,000 r.p.m 30分で沈殿する fraction に最も強かった。

3. sonic oscillation により formic dehydrogenase はあまり失活しないが, DHA 還元酵素力は可成り低下した。水素ガスによる置換, cystein の添加, 低温処理によっても同酵素力の低下は防止し得なかった。

終りに臨み懇切な御教示を賜った京都大学食糧科学研究所前所長藤村吉之助先生ならびに池田静徳助教授に対し深謝の意を表す。

文 献

- 1) B. P. Eddy, Biochem. J., **50**, 601 (1952)
- 2) K. Fujimura and S. Ikeda, Mem. Resear.

Inst. Food Sci., Kyoto Univ., **11**, 30 (1956)

- 3) K. Fujimura and S. Ikeda, *ibid.*, **12**, 24 (1957)
- 4) K. Fujimura and S. Ikeda, *ibid.*, **12**, 38 (1957)
- 5) B. P. Eddy, M. Ingram and L. W. Mapson, Biochem. J., **58**, 254 (1954)
- 6) 牧 善輔, 西京大学報告, 家政学, 2 卷, 4 号, 83 (1957)
- 7) M. Alexander, Bacteriol. Revs., **20**, 67 (1956)
- 8) A. G. Marr, and E. H. Cota-Robles, J. Bacteriol., **74**, 79 (1957)
- 9) A. Temperli, Biochim. Biophys. Acta, **38**, 557 (1960)
- 10) J. H. Roe and M. Oesterling, J. Biol. Chem., **152**, 511 (1944)
- 11) 毛戸澄子, 池田静徳, 藤村吉之助, 栄養と食糧 **13**, 242 (1960)